



# UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

## TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Criopreservación de nematodos por ultracongelación para su uso en el control biológico de plagas de la vid

Autor/es

ISABEL CUADRADO GALERA

Director/es

IGNACIO PÉREZ MORENO y RAQUEL CAMPOS HERRERA ,

Facultad

Facultad de Ciencia y Tecnología

Titulación

Grado en Enología

Departamento

AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN

Curso académico

2018-19



***Criopreservación de nematodos por ultracongelación para su uso en el control biológico de plagas de la vid***, de ISABEL CUADRADO GALERA  
(publicada por la Universidad de La Rioja) se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.  
Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.



# UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**Facultad de Ciencia y Tecnología**

Criopreservación de nematodos por  
ultracongelación para su uso en el  
control biológico de plagas de la vid

REALIZADO POR:

ISABEL CUADRADO GALERA

TUTELADO POR:

IGNACIO PÉREZ MORENO  
RAQUEL CAMPOS HERRERA

**Logroño, junio, 2019**

## RESUMEN

Almacenar y conservar organismos modelo tales como nematodos entomopatógenos (NEP) y nematodos de vida libre (NVL) es un requisito imprescindible para el mantenimiento de colecciones internacionales y su utilización a largo plazo. Tales protocolos permiten albergar una elevada variabilidad ecológica y genética de organismos para su evaluación en distintas aproximaciones agroambientales, tales como la selección de candidatos que presenten las características óptimas de supervivencia, reproducción y capacidad infectiva para controlar los posibles insectos plaga diana. A pesar de su gran importancia, esta actividad requiere la optimización de protocolos de crio-preservación cuyas características dependerán de la especie a almacenar, de forma que garanticen la viabilidad y/o capacidad infectiva de los nematodos tras su almacenamiento.

El objetivo de este TFG es desarrollar los experimentos preliminares de criopreservación a  $-80^{\circ}\text{C}$  como método de almacenamiento y conservación de los NEP y NVL de la colección mundial de In-Vid (ICVV), usando glicerol como agente crioprotector, y evaluar sus efectos en la viabilidad e infectividad de estos nematodos sobre larvas de *Galleria mellonella*, utilizadas como insecto modelo, y de *Lobesia botrana* como plaga característica del viñedo.

Finalmente, se ha demostrado que es posible que los nematodos sobrevivan a una etapa de congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ , siempre y cuando se haya utilizado glicerol como crioprotector. Esta supervivencia es variable y dependiente tanto del tiempo de exposición al glicerol, la concentración utilizada de este y la especie de nematodo elegida, así como la concentración de la misma.

Además, bajo ciertas circunstancias, los NEP criopreservados mantienen su capacidad infectiva frente a larvas de *G. mellonella* y *L. botrana*, dato importante para estudios posteriores de selección de especies para el control biológico.

## ABSTRACT

Storing and conserving model organisms such as entomopathogenic nematodes (EPNs) and free-living nematodes (FLNs) is a requirement for the maintenance of international collections for long-term use. Such protocols allow a high ecological and genetic variability of organisms to be evaluated for different agro-environmental approaches, such as the selection of candidates that have the best characteristics of survival, reproduction and infective capacity to control the possible target pest insects. Despite its great importance, this activity requires the

optimization of cryopreservation protocols whose characteristics will depend on the specie to be stored, so as to guarantee the viability and/or infective capacity of the nematodes after storage.

The objective of this TFG is to develop the preliminary cryopreservation experiments at -80°C as a method of storage and conservation of the EPNs and FLNs of the global collection of In-Vid (ICVV), using glycerol as a cryoprotective agent, and to evaluate its effects in the viability and infectivity of these nematodes on larvae of *Galleria mellonella*, used as a model insect, and of *Lobesia botrana* as a characteristic plague of the vineyard.

Finally, it has been shown that it is possible for nematodes to survive a freezing stage at -80°C, provided that glycerol has been used as a cryoprotectant. This survival is variable and depends both on the time of exposure to glycerol, the concentration used thereof and the species of nematode chosen, as well as the concentration thereof.

In addition, under certain circumstances, cryopreserved EPNs maintain their infective capacity against larvae of *G. mellonella* and *L. botrana*, important data for subsequent studies of species selection for biological control

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	4
1.1 NEMATODOS.....	4
1.2 NEMATODOS DE VIDA LIBRE (NVL).....	5
1.2 NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS (NEP).....	6
1.3 CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE NEMATODOS .....	8
1.4 PLAGAS POTENCIALMENTE CONTROLADAS POR NEP .....	8
1.5 OBJETIVO.....	10
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	11
2.1 CRÍA Y MANTENIMIENTO DE ORGANISMOS .....	11
2.2 PROCEDIMIENTOS GENERALES.....	12
2.3 EXPERIMENTO NVL: CRIOPRESERVACIÓN Y CONGELACIÓN .....	14
2.4 EXPERIMENTO NEP: CRIOPRESERVACIÓN Y CONGELACIÓN.....	15
2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	17
3. RESULTADOS .....	18
3.1 NEMATODOS DE VIDA LIBRE.....	18
3.2 NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS .....	20
3.2.1 VIABILIDAD DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS.....	20
3.2.2 CAPACIDAD INFECTIVA DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS ....	25
4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....	26
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	28
ANEXO I .....	31

## 1. INTRODUCCIÓN

El desmesurado uso de productos químicos, principalmente procedente de los plaguicidas, provoca una disminución o degradación de la calidad de las aguas, la contaminación de los suelos, aparición de resistencias por parte de los insectos contra los que van destinados dichos plaguicidas y, con ello, problemas asociados a la salud del ser humano. Proporcionar herramientas sostenibles para disminuir la dependencia de los productos fitosanitarios tradicionales es necesario para hacer posible el cumplimiento de la Directiva de la UE sobre el uso sostenible de los productos fitosanitarios (Directiva 2009/128 / CE), implementada en España en el Real Decreto 1113/2012 del 21 de septiembre.

### 1.1 NEMATODOS

Hay unas 25000 especies de nematodos conocidas, y se piensa que podría haber más de un millón de especies en total (Stock, 2015). Por tanto, estos organismos representan aproximadamente el 80% de los animales de la Tierra, y han conseguido adaptarse a diversos ecosistemas, tanto acuáticos (agua salada y dulce) como terrestre (regiones polares, tropicales...). La mitad de estas especies son parásitas (Gil-Recio, 2016)

Los nematodos son organismos invertebrados, pluricelulares, acuáticos, que pueden ser, bien de vida libre, o bien, entomopatógenos, parásitos de animales y plantas. Estos últimos han sido el centro de todas las investigaciones por el daño que pueden acarrear en actividades como la agricultura o la ganadería, además de poder afectar a la salud humana (Stirling *et al.*, 1988). No obstante, muchas de estas especies de nematodos entomopatógenos pueden resultar beneficiosas, principalmente, para el control biológico de plagas (Campos-Herrera, 2015).

El tamaño de los nematodos oscila entre los 0,1 mm y los 2,5 mm de longitud, aunque hay especies que superan estas medidas, pudiendo llegar a medir incluso metros, como la especie *Placentonema gigantissima* (Rhabditida: Tetrameridae), parásito de las ballenas. Son organismos transparentes y simples, estructuralmente hablando, aunque su reproducción puede ser tanto sexual como por partenogénesis. Las especies pueden ser dioicas, es decir, se pueden encontrar machos y hembras, o hermafroditas. Es de vital importancia conocer si la especie con la que se van a llevar a cabo los experimentos es dioica o hermafrodita, puesto que, si es hermafrodita, tendrá capacidad de autofecundación y un único nematodo superviviente al experimento podrá mantener la especie.

El ciclo de vida de los nematodos dependerá de si son de vida libre o parásitos. El tiempo para alcanzar la edad adulta varía desde los pocos días hasta más de un año en algunas especies, principalmente parásitas. La duración del ciclo biológico dependerá de las condiciones ambientales (temperatura, humedad) y, en el caso de los nematodos parásitos, de la especie hospedante. Todos los nematodos tienen seis fases de desarrollo: huevo, cuatro etapas juveniles, que se completan con mudas, y la fase adulta, en la que desarrollan todo su sistema reproductor.

## 1.2 NEMATODOS DE VIDA LIBRE (NVL)

Los NVL son de gran importancia para la investigación científica a nivel mundial, debido a su ciclo biológico, su tamaño pequeño, su rapidez de crecimiento y a su facilidad de cría. Los NVL tienen normalmente un ciclo de vida corto, es decir, desde que están en fase de huevo pueden tardar aproximadamente 3 días a 25°C hasta la puesta de nuevos huevos (Ann *et al.*, 2015). Durante su ciclo de vida se suceden seis etapas: huevo, cuatro estadios larvarios (L1, L2, L3 y L4) (Figura 1) en los cuales el nematodo va aumentando su tamaño, y adulto.

En muchos casos, como el del nematodo modelo *Caenorhabditis elegans* (*Rhabditida: Rhabditidae*), presentan principalmente individuos hermafroditas, aunque con una frecuencia del 0.2% pueden aparecer machos a partir de estadio L4 (Hope, 1999). Las formas hermafroditas son básicamente hembras que, de forma temporal, producen esperma que almacenan y, tras la producción de oocitos, pueden autofertilizarse (Corsi *et al.*, 2015).

Una característica peculiar de los NVL es que podemos encontrar un estadio de resistencia como respuesta a la aparición de condiciones ambientales desfavorables, denominado larva *dauer*. Por ejemplo, en el caso de *C. elegans*, este estadio sucede al final de la etapa L2 y puede prolongarse durante varios meses. Tras esta etapa de larva *dauer*, el individuo pasará al estadio L4 y continuará desarrollándose (Golden & Riddle, 1984). Las larvas *dauer* guardan cierta similitud con las larvas infecciosas (juveniles infectivos) de los NEP.

Estos nematodos presentan distintos grupos tróficos, ya que según la especie se alimentan de bacterias, hifas de hongos, levaduras, algas, etc. No obstante, para facilitar su cría en el laboratorio, normalmente se emplean medios artificiales que contienen suplementos vitamínicos o incluso bacterias y hongos en crecimiento controlado, como por ejemplo, suplementar los medios con la cepa OP50 de la bacteria *Escherichia coli* (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae) (Stiernagle, 2006). Primeramente, los nematodos agotan estas bacterias y, posteriormente, utilizarán su reservorio de grasas para alimentarse (Barrière & Félix, 2014). Además, en un contexto más amplio de ecología del suelo, también pueden ser presa de insectos, ácaros o colémbolos, en el medio terrestre, e incluso de crustáceos y peces, en el medio acuático.



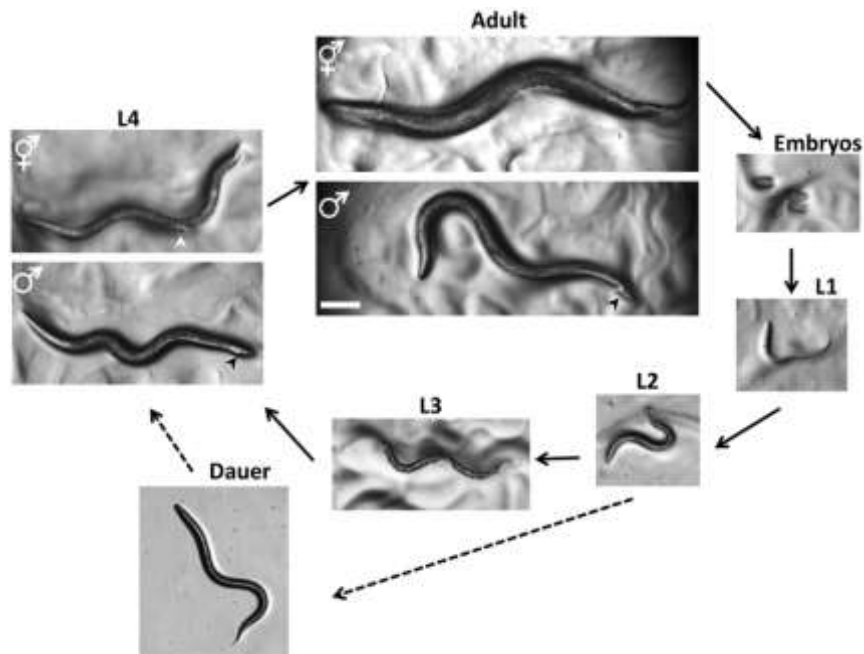


Figura 1. Ciclo biológico de nematodos de vida libre (*C. elegans*). Fuente: K. Corsi et al., *Wormbook*, 2015.

## 1.2 NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS (NEP)

Los NEP de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* tienen un gran potencial en cuanto a su labor en control biológico de plagas (Campos-Herrera, 2015) (Figura 2).

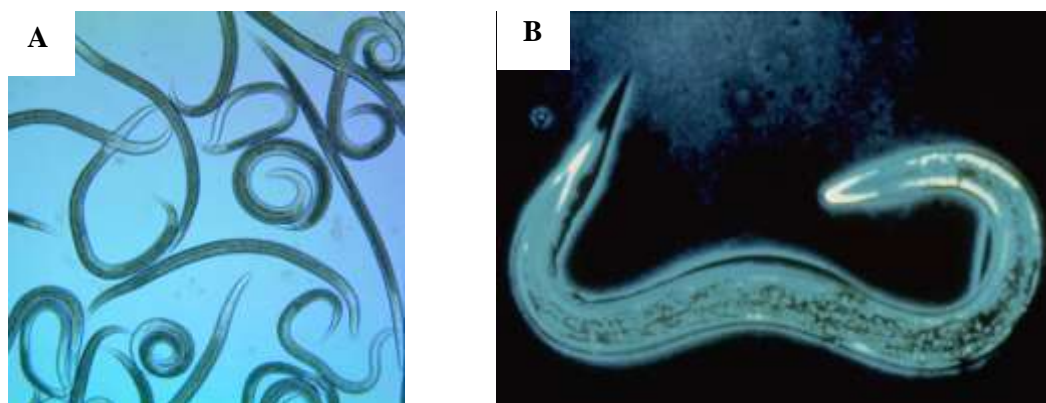


Figura 2. Nematodos entomopatógenos. Especie *S. feltiae* (Figura 2A. Fuente: [www.planetnatural.com](http://www.planetnatural.com)). Especie *H. bacteriophora* (Figura 2B. Fuente: [www.nuetzlinge.de](http://www.nuetzlinge.de)).

Son organismos de cuerpo blando y vermiformes, que se encuentran en el suelo de manera natural (Kaya *et al.*, 2006). Son parásitos obligados, aunque excepcionalmente pueden también funcionar como carroñeros (San Blas & Gowen, 2008; Blanco-Pérez *et al.*, 2019). Los NEP son

capaces de encontrar a un insecto huésped mediante las emisiones de CO<sub>2</sub> que estos producen, vibraciones u otro tipo de señales (Griffin, 2015). El estadio L3 es similar a las larvas *dauer* de los NVL, y se denomina juvenil infectivo (JI), que son los responsables de buscar y penetrar en el insecto huésped, a través de sus orificios naturales (ano, boca y espiráculos) (Boemare, 2002; Poinar, 1990). Utilizan las larvas de los insectos a los que parasitan para poder desarrollar su ciclo biológico.

Los NEP de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* han desarrollado una relación simbiótica con bacterias (*Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, respectivamente), que son las que propician que el insecto muera gracias a la producción de metabolitos secundarios. Además, las bacterias producen sustancias como bacteriocinas, antibióticos, etc., por lo que cumplen un papel importante en la protección de los NEP dentro del insecto huésped (Chen *et al.*, 1994). El ciclo biológico comienza una vez los JI han localizado al insecto huésped. Tras penetrar en el insecto y alcanzar el hemocele, liberan la bacteria, que digerirá los tejidos del insecto, se multiplicará y provocará su muerte. Los nematodos se alimentarán de los tejidos que han degradado las bacterias y, así, continuarán su desarrollo durante una, dos o, incluso, tres generaciones antes de volver a desarrollar una nueva generación de JI. Antes de que estos JI de la última generación salgan al exterior del insecto en busca de otro hospedador, incorporarán nuevamente la bacteria en su interior (Figura 3).



Figura 3. Evolución de las asociaciones nematodo-insecto y ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos.  
Fuente: Adaptado de Dillman et al. (2012).

### 1.3 CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE NEMATODOS

Ya que los nematodos (NEP y NVL) son acuáticos, la forma más simple de almacenamiento es en medio líquido (suspensiones acuosas, superficies húmedas, etc.). Sin embargo, se han encontrado múltiples inconvenientes prácticos, como, por ejemplo, la falta de aireación, la temperatura... que puede afectar a la supervivencia y actividad. Otro método de almacenamiento, principalmente utilizado para los NEP, es la utilización de compuestos inertes (gel fluido, alginato, gel de poliacrilamida, etc.) que contienen ciertas moléculas capaces de reducir la movilidad o de inhibir su metabolismo (Georgis, 1990; Vemmer & Patel, 2013). No obstante, también tienen desventajas a la hora de su utilización, como puede ser la aparición de contaminantes microbianos o cambios en las diferentes propiedades de los sustratos, que van a comprometer el buen almacenamiento de las colecciones de estos nematodos y que, por lo tanto, afectará a su viabilidad y capacidad infectiva.

Por otro lado, la criopreservación por ultracongelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  de los nematodos es un método que puede ser viable para el almacenamiento y conservación. Lo que pretende este método es una disminución de la temperatura para reducir el metabolismo celular de estos organismos y, así, poder preservar los tejidos celulares durante largos periodos de tiempo. También posibilita que el desarrollo de los nematodos se reanude con normalidad tras la conservación. Este método podrá ser efectivo siempre y cuando se utilice previamente un agente crioprotector, como puede ser el glicerol, cuyas propiedades fueron descubiertas por Polge *et al.* (1949). Por lo tanto, el glicerol es un crioprotector permeable que actúa en la deshidratación de la célula, extrayendo el agua de su citoplasma y, así, evita que se formen cristales de hielo en su interior.

Establecer protocolos efectivos de conservación de estos nematodos permitirá poner a disposición de los investigadores un amplio abanico de especies y poblaciones de organismos para la selección de los mejores candidatos para el control biológico de plagas.

### 1.4 PLAGAS POTENCIALMENTE CONTROLADAS POR NEP

Los NEP son capaces de controlar plagas de coleópteros, hemípteros y lepidópteros (Georgis et al., 2006).

La polilla de la cera, *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) (Figura 4), constituye una plaga en las colmenas de abejas melíferas, donde la oruga se alimenta de la cera de las abejas. Se considera un insecto modelo a la hora de evaluar la capacidad infectiva de los

NEP, por ello, se usará en el trabajo para compararlo con la efectividad en la infección de los NEP con respecto a otras plagas específicas de la vid, como lo es *Lobesia botrana*.



Figura 4. Larvas de *Galleria mellonella* utilizadas para el experimento de mortalidad de los nematodos entomopatógenos

La polilla del racimo, *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) es una plaga clave que destaca en el viñedo de la cuenca mediterránea, aunque está distribuida tanto por Europa, como por Norte de África, Japón e incluso en Sudamérica, ya que en el año 2008 se introdujo en Chile debido al transporte de material vegetal. En España, su importancia varía en función de la región y las condiciones climáticas asociadas. Se considera que produce daños muy graves en la costa mediterránea (Cataluña, Valencia, Alicante), graves en Andalucía, Extremadura, Aragón, La Rioja y Navarra, y menos graves o anecdóticos el resto de las regiones (Centro y Cornisa Cantábrica) (Coscollá, 1997).

Los daños directos causados por *L. botrana* son debidos a la alimentación de las larvas sobre los racimos de la vid. La primera generación de larvas produce glomérulos de botones florales, destruyéndolos (Figura 5). Este daño suele ser poco importante, puesto que puede haber una compensación con un mejor cuajado o bayas de mayor tamaño, salvo que la densidad de plaga sea muy alta.



Figura 5. Glomérulo ocasionado como daño de una larva de *Lobesia botrana* de primera generación. Fuente: Pérez Moreno, 2014.

Por su parte, las larvas de *L. botrana* de segunda y tercera generación penetran en el interior de las bayas y se alimentan de la pulpa, produciendo daños poco significativos en el caso de uva de vinificación. Los daños más graves que ocasiona esta plaga son los daños indirectos, ya que, al penetrar en las bayas, las larvas producen orificios que sirven de vía de entrada de microorganismos que producen podredumbre gris (*Botrytis cinérea*) y ácida (*Acetobacter*, *Sacharomyces* y *Kloeckera*) muy importantes en uva de vinificación (MAPA, 2004) (Figura 6).



Figura 6. Daño ocasionado por las larvas de tercera generación de *Lobesia botrana*. Fuente: [www.vitivinicultura.net](http://www.vitivinicultura.net)

Por tanto, debido a los daños que produce, todos los años es necesario aplicar alguna medida de control. Hasta el momento, los métodos más usados para su control son los insecticidas convencionales neurotóxicos, que afectan a su sistema nervioso, como pueden ser metil clorpirifos, clorantraniliprol, spinosad, indoxacarb, etc., y en menor medida insecticidas microbiológicos (*Bacillus thuringiensis*), biorracionales (fenoxicarb, tebufenocida, metoxifenocida) y el método de confusión sexual (Román-Fernández *et al.*, 2013). El uso irracional de estos fitosanitarios de síntesis ha dado lugar a un gran impacto ambiental. Por ello, la Unión Europea promueve y trata de adaptar, cada vez más, la agricultura y, en especial la viticultura sostenible, con prácticas cuyo objetivo es producir, de manera rentable, productos de calidad y sin alterar el medio ambiente, como, por ejemplo, el empleo de enemigos naturales de plagas.

## 1.5 OBJETIVO

El objetivo de este TFG es desarrollar los experimentos preliminares de crío-preservación a -80°C como método de almacenamiento y conservación de los NEP y NVL de la colección mundial de In-Vid (ICVV), usando glicerol como agente crioprotector, y evaluar sus efectos en la viabilidad e infectividad de los NEP sobre larvas de *Galleria mellonella*, utilizadas como insecto modelo, y de *Lobesia botrana*, como plaga importante del viñedo.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 CRÍA Y MANTENIMIENTO DE ORGANISMOS

Para implementar los protocolos de criopreservación de nematodos, se utilizaron dos especies de NVL (*Pristionchus maupasi* AM-3 y *Caenorhabditis elegans* AM152-B) y tres de NEP (*Steinernema feltiae* RM-107, *Steinernema riojaense* RM-30 y *Heterorhabditis bacteriophora* RM-102). Todos los organismos han sido identificados morfológica y molecularmente con anterioridad (Blanco-Pérez *et al.*, 2019; Campos-Herrera, comunicación personal).

Para la multiplicación de NVL, se tomaron 20 µL de un flash con cada especie y se inocularon en placas con Nutrient Agar (Anexo I). Se utilizaron 10 placas Petri de 9 cm de diámetro para cada especie. Se cerraron con parafilm y se envolvieron con papel aluminio, para garantizar la oscuridad. Se mantuvieron a temperatura ambiente durante 1 semana, verificando el desarrollo de los nematodos cada 3-4 días. Una vez que se observó una producción elevada de nematodos por placa, se añadió 3-4 mL de Buffer M9 (Anexo I) a cada placa para recoger el máximo de nematodos en superficie y bacterias asociadas. Para poder limitar la concentración de bacterias acompañantes de cada NVL, se decantó la suspensión recogida durante 40-50 minutos, se eliminó el máximo de volumen y se añadió Buffer M9 2-3 veces. Tras verificar que la suspensión quedaba traslúcida, se vertió la suspensión concentrada en dos flashes por especies. Se almacenaron a 14°C en oscuridad.

Para la multiplicación de NEP, se siguió la metodología propuesta por Woodring & Kaya (1988). Brevemente, para cada una de las especies, se dispusieron dos placas de Petri de 5.5 cm diámetro con un papel de filtro Whatman no. 1 y 4 larvas de *G. mellonella*. A continuación, se inocularon las especies de NEP, con 400 µL de la suspensión almacenada de no más de 2 meses de antigüedad. Se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad durante 3-4 días, momento en el que se verificó la mortalidad de las larvas. Los cadáveres se dispusieron en forma de estrella en la placa para favorecer la emergencia posterior de los JI, y el conjunto se dispuso dentro de una placa de Petri 9 cm. diámetro con agua para poder recoger los nematodos tras su emergencia. Se almacenaron a 14°C en oscuridad.

Los insectos se criaron en condiciones de laboratorio con dieta artificial. Para la polilla de la cera, *G. mellonella*, se siguió la metodología descrita por Blanco-Pérez *et al.* (2019), mientras que para *L. botrana* se siguió el procedimiento propuesto por Del Tío (1996) y la modificación de la dieta semisintética utilizada por Sáenz de Cabezón (2003).

## 2.2 PROCEDIMIENTOS GENERALES

El experimento de los NVL se basó en el protocolo descrito por Herrmann *et al.* (2006), con ligeras variaciones, mientras que, para el experimento de los NEP, se siguió la metodología descrita por Guide *et al.* (2016), también con ligeras modificaciones en cuanto a concentraciones de glicerol, concentraciones iniciales de nematodos y procedimiento de congelación.

### *Recuentos para establecer las concentraciones iniciales de NVL y NEP*

Tanto para los NVL como los NEP, la suspensión a cuantificar se dispuso en un vaso de precipitados y se agitó a 300 rpm durante 2-3 minutos mediante un agitador magnético (ref. Velp Scientifica). Para realizar los recuentos, con la ayuda de una micropipeta se tomaron alícuotas de 20  $\mu$ L de la suspensión de nematodos y se dispusieron en una placa de recuento (Figura 7) para establecer el número de nematodos presentes mediante un contador manual bajo una lupa binocular (ref. Motic). Este procedimiento se realizó siempre 2-3 veces. De esta forma, fue posible conocer la concentración de NVL o de JI que había en 20  $\mu$ L y, por tanto, se pudo calcular la concentración necesaria para 900  $\mu$ L y 2000  $\mu$ L que se necesitarían, respectivamente, *a posteriori*.

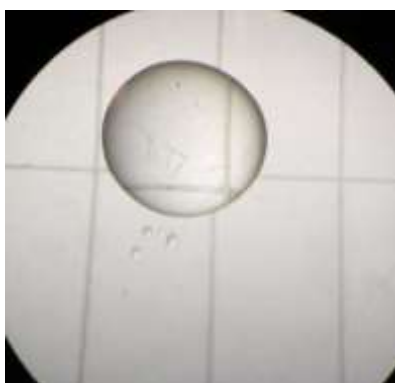


Figura 7. Nematodos sobre placa de recuento.

### *Recuentos para las pruebas de viabilidad de NVL y NEP*

Para poder llevar a cabo la prueba de viabilidad de los NVL, se pusieron 20  $\mu$ L de cada uno de los tubos Eppendorf en placas con Nutrient Agar de 5.5 cm de diámetro y se procedió al conteo de nematodos vivos bajo la lupa binocular. Por cada Eppendorf se utilizaron 2 placas y se hicieron 2 recuentos de cada placa.

En el caso de los NEP, para la prueba de viabilidad tras el pretratamiento en glicerol, de cada una de las placas que se habían mantenido en glicerol, se tomó una alícuota de 50  $\mu$ L para *S. riojaense* y 10  $\mu$ L para *S. feltiae*, ya que había más concentración de esta última especie, y se



dispusieron en una placa de recuento como se ha descrito anteriormente. Se procedió al conteo por duplicado de cada placa.

Para la prueba de viabilidad tras la congelación en los NEP, se hicieron conteos de cada placa que había sido atemperada durante 24 horas en solución salina. Se llevó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  a una placa de recuento (Figura 8), y se contó el número de nematodos total, diferenciando entre muertos y vivos (solamente se anotó como vivos aquellos nematodos en los que se observó movimiento).



Figura 8. Nematodos observados bajo lupa binocular, preparados para el conteo de la prueba de viabilidad.

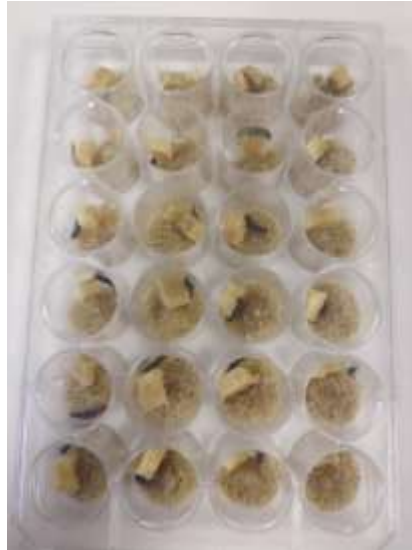
#### *Incubación a $-80^{\circ}\text{C}$ en congelador*

Tanto en el protocolo de NVL como de NEP, todas las incubaciones de criopreservación se realizaron en un ultracongelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  (ref. Thermo Scientific) en cajas individualizadas para garantizar la oscuridad.

#### *Prueba de mortalidad y capacidad infectiva de los NEP*

Para la prueba de mortalidad se utilizaron placas multipocillos de 24 disposiciones (Figura 9). En cada uno de los pocillos se introdujeron 200  $\mu\text{L}$  de los nematodos ya atemperados, 1 g de arena lavada y autoclavada, que sirve como sustrato a los nematodos para que puedan desplazarse y localizar a la larva, y 1 larva de *G. mellonella*. Para cada tubo crionizado, se utilizaron 6 larvas, incluyendo además 6 pocillos como control del mismo modo, pero con agua en lugar de nematodos. El mismo procedimiento se utilizó para comprobar la mortalidad de *L. botrana*. En este caso, únicamente se utilizaron nematodos de la especie *S. feltiae* con un pretratamiento en glicerol de 48 horas y un tiempo de congelación de 1 semana.





*Figura 9. Placa multipocillos para la prueba de mortalidad de Lobesia botrana.*

### 2.3 EXPERIMENTO NVL: CRIOPRESERVACIÓN Y CONGELACIÓN

Primero, se realizó un protocolo de limpieza y concentración como el descrito en el punto 2.1, con la salvedad de que se realizó en condiciones de frío para ir aclimatando a los nematodos (Figura 10).



*Figura 10. Procedimiento de decantación de los nematodos de vida libre en hielo.*

Tras el recuento de nematodos de partida por especies, se añadieron 900  $\mu\text{L}$  de cada suspensión de nematodos en tubos Eppendorf de 2 mL estériles. A continuación, se vertió en los tubos la misma cantidad de Soft Agar Freezing Solution (Anexo I), solución que aporta el efecto crioprotector. Se utilizaron dos soluciones de Soft Agar Freezing Solution en función de la

concentración de glicerol: 24% y 30%. Al verterlo a partes iguales con la suspensión de nematodos, se obtuvo una concentración del 12% y del 15% de glicerol. Para cada tratamiento se prepararon 3 tubos independientes, siendo los factores la especie (*C. elegans* y *P. maupasi*) y la concentración final de glicerol (12% y 15%). De forma inmediata, los tubos se guardaron en su caja de criopreservación y se almacenaron a -80°C durante 24 horas. Trascurrido ese tiempo, se sacaron del congelador 3 tubos Eppendorf de cada concentración por cada especie, y se llevó a cabo la prueba de viabilidad (Figura 11).

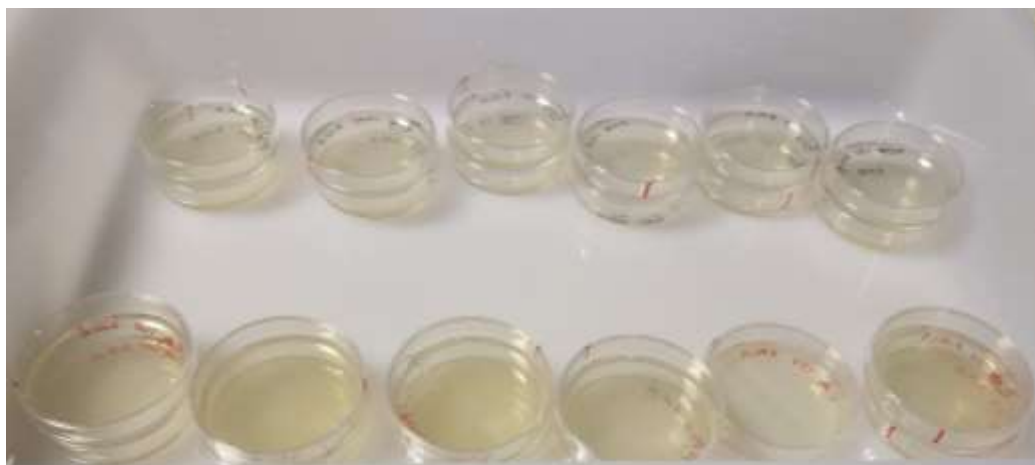


Figura 11. Placas de 5 cm de diámetro con Nutrient Agar, inoculadas con los NVL, para la prueba de viabilidad.

En total, se realizaron 3 repeticiones del experimento, utilizando siempre material nuevo (nematodos, soluciones, etc.), con ligeras variaciones entre ellas, que trataron de mejorar los resultados obtenidos en los estudios anteriores. Las concentraciones de nematodos por tubo para el experimento 1, 2 y 3 fueron 22095, 2048 y 108 para *C. elegans*, y 5513, 6165, y 918 para *P. maupasi*, respectivamente.

## 2.4 EXPERIMENTO NEP: CRIOPRESERVACIÓN Y CONGELACIÓN

Se realizó el conteo de los JI para determinar la concentración inicial antes de su exposición a la solución de glicerol 30% (Anexo I). Así, estimamos una concentración de 4100 JI/2 ml para *S. riojaense* y de 28900 JI/2 ml para *S. feltiae*.

Se prepararon placas de diámetro 5,5 cm para las dos especies. En las placas se pusieron 2 ml de la solución de nematodos, y 2 ml de glicerol al 30%. Como están a partes iguales, se consiguió una concentración de glicerol del 15%. Los factores en investigación fueron la especie

(*S. feltiae* y *S. riojaense*), el pretratamiento con glicerol (24 y 48 horas) y el tiempo en ultracongelación (24 horas y 1 semana), teniendo 3 réplicas por tratamiento. El estudio de viabilidad de los JI se realizó tras el pretratamiento con glicerol de 24 o 48 horas, tal y como se describe en el punto 2.2. Posteriormente, para eliminar el glicerol, se procedió al filtrado de las placas, siguiendo el procedimiento de Guide *et al.* (2016). Para ello, se utilizó un Buchner, que permite filtrar por vacío, papel de filtro Whatman nº42 y solución salina (Anexo I). En primer lugar, se vertieron 5 ml de la solución salina y se filtró. Después se vertió el contenido de la placa sobre el papel Whatman, se lavó la placa con 5 ml de la misma solución salina, se vertió sobre el papel y se filtró (Figura 12). Se retiró el papel de filtro del Buchner y se introdujo en un tubo Eppendorf de 2 ml estéril.



Figura 12. Buchner utilizado para el experimento de los nematodos entomopatógenos.

Tras su congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y dependiendo del tiempo experimental de incubación (24 horas o 1 semana), se resuspendieron en 15 ml de solución salina de NaCl al 0,7% en placas de Petri de 9 cm de diámetro, donde se mantuvieron durante 24 horas. Por último, se llevaron a cabo pruebas de viabilidad y de mortalidad descritas en el punto 2.2.

Para la segunda repetición del experimento, la metodología tuvo pequeñas variaciones. En este caso, se utilizaron nematodos de la especie *H. bacteriophora* a una concentración inicial de 5200 JI/2 ml. En este caso, sólo hubo un tiempo de congelación, 24 horas. La principal diferencia fue que se prepararon 6 placas utilizadas como control de la viabilidad, en las que se pusieron 2 ml de solución de nematodos y 2 ml de agua. Estas placas control se mantuvieron a  $14^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas (3 placas) y 48 horas (3 placas).

## 2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de todos los datos presentados se realizó mediante el programa estadístico SPSS (IBM SPSS 23). Los datos presentados en las gráficas y tablas son la media y el error estándar de la media (SEM, de la abreviatura en inglés). Se calculó el porcentaje de viabilidad de NVL tras la exposición a los tratamientos teniendo en cuenta los nematodos vivos y muertos. De forma similar, se estableció el porcentaje de viabilidad de los JI de NEP y de las larvas de *G. mellonella* o *L. botrana* en los experimentos de mortalidad. El análisis de viabilidad de los NVL tras la congelación se realizó mediante con un modelo lineal general univariado, con “porcentaje de NVL viables” como variable dependiente, y como factores fijos “especie” y “tratamiento de glicerol”. Para el análisis estadístico de los resultados de la prueba de viabilidad tras el pretratamiento en glicerol para los NEP, se utilizó un modelo lineal general univariado, cuya variable dependiente era el “porcentaje de NEP viables” y los factores fijos fueron tiempo de “pretratamiento en glicerol” y “especie”. Por otro lado, para las pruebas de viabilidad tras la congelación se llevó a cabo el mismo procedimiento, esta vez con “porcentaje de NEP viables tras congelación” como variable dependiente y como factores fijos “especie” y “tiempo de pretratamiento en glicerol”, llevándolo a cabo dos veces para los dos tiempos de congelación (24 horas y 1 semana). Los datos resultantes de las pruebas de mortalidad de *G. mellonella* y *L. botrana*, para conocer la capacidad infectiva de los NEP tras la congelación, también se analizaron estadísticamente con un modelo lineal general univariado. La variable dependiente, en este caso, fue el “porcentaje de mortalidad de larvas del insecto” en cuestión, y los factores fijos fueron “la especie” y “el tiempo de pretratamiento en glicerol”. Se llevó a cabo dos veces, una para cada tiempo de congelación.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 NEMATODOS DE VIDA LIBRE

En el primer experimento, se partió de una concentración de 22095 NVL/900  $\mu$ L para *C. elegans* y de 5513 NVL/900  $\mu$ L para *P. maupasi*. No se observaron diferencias significativas en la viabilidad de los NVL en función de la concentración de glicerol en el pretratamiento pre-congelación ( $F_{1, 12} = 3,521$ ,  $P = 0.097$ ) (Figura 13A). Sin embargo, la viabilidad de los nematodos de *C. elegans* fue significativamente superior a la observada para *P. maupasi* ( $F_{1, 12} = 14,932$ ,  $P = 0,005$ ) (Figura 13A). Finalmente, no se observaron interacciones entre la especie y el tratamiento de glicerol ( $F_{1, 12} = 0,306$ ,  $P = 0.596$ ).

De acuerdo con los resultados del primer experimento, en el segundo, donde se utilizó una concentración inicial de 2048 NVL/900  $\mu$ L para *C. elegans* y de 6165 NVL/900  $\mu$ L para *P. maupasi*, tampoco se observó un efecto en la viabilidad de los NVL en cuanto a la concentración de glicerol, utilizada como criopreservante previamente a la congelación ( $F_{1, 13} = 1,921$ ,  $P = 0,199$ ) (Figura 13B). No obstante, sí que se aprecian diferencias significativas con respecto a la utilización de una u otra especie en la viabilidad de los NVL, siendo *C. elegans* la especie que mayor viabilidad presenta ( $F_{1, 13} = 6,733$ ,  $P = 0,029$ ) (Figura 13B). La interacción entre la especie y el pretratamiento de glicerol utilizado no es significativa. ( $F_{1, 13} = 2,040$ ,  $P = 0,187$ ) (Figura 13B).

En cuanto al tercer experimento, la concentración inicial empleada fue de 108 NVL/900  $\mu$ L para *C. elegans* y de 918 NVL/900  $\mu$ L para *P. maupasi*. No se observaron diferencias significativas en la utilización de una u otra concentración de glicerol en el pretratamiento con respecto a la viabilidad de los NVL ( $F_{1, 24} = 2,105$ ,  $P = 0,162$ ) (Figura 13C). Además, en contraposición con los resultados de los otros dos experimentos, en cuanto a la especie, tampoco se observaron diferencias significativas en la viabilidad de los NVL en este tercer experimento ( $F_{1, 24} = 2,921$ ,  $P = 0,103$ ) (Figura 13C). No se observaron interacciones entre la especie y la concentración de glicerol utilizada previamente a la congelación ( $F_{1, 24} = 2,105$ ,  $P = 0,162$ ) (Figura 13C).

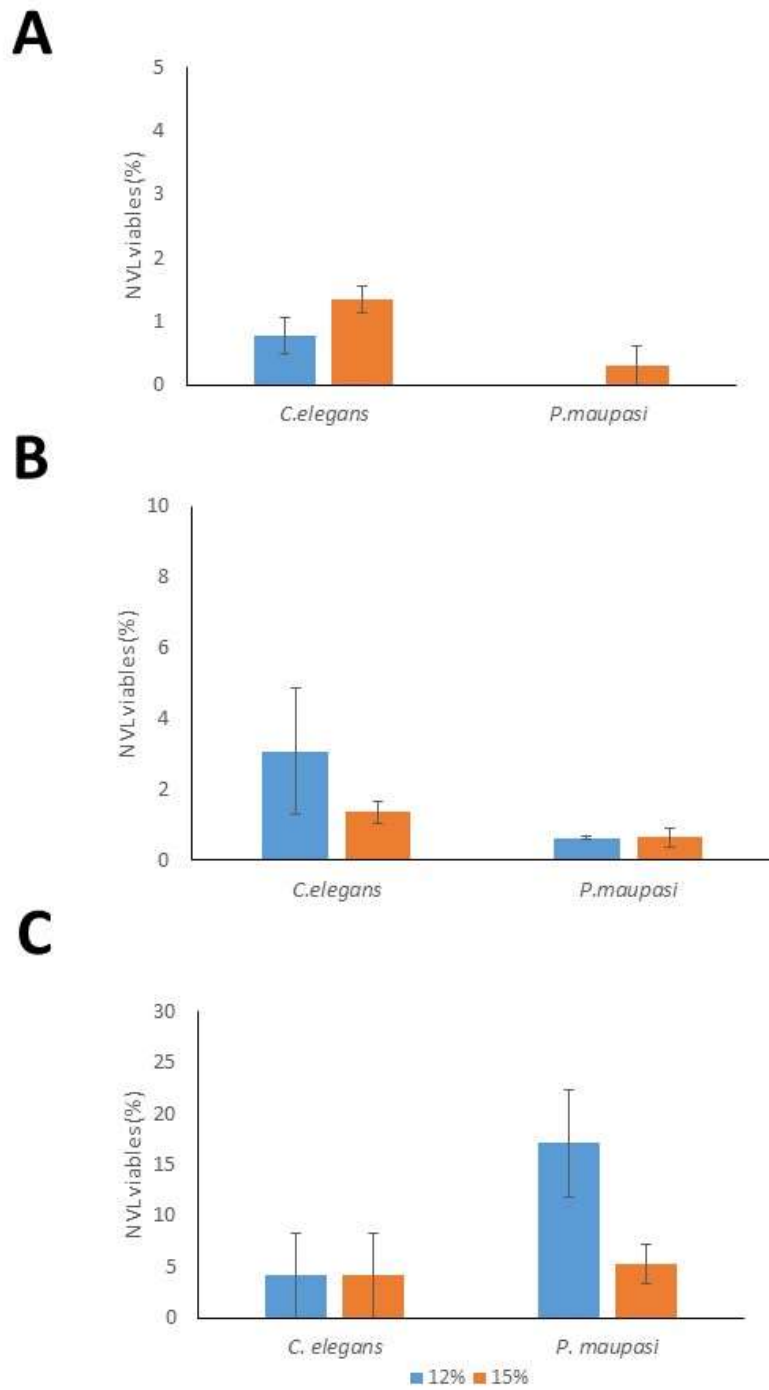


Figura 13. Efecto de la concentración de glicerol (12% y 15%) en la viabilidad de los nematodos de vida libre *C. elegans* y *P. maupasi*, tras la congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas, en los experimentos llevados a cabo (Figura 13A, primer experimento; Figura 14B, segundo experimento; Figura 14C, tercer experimento).

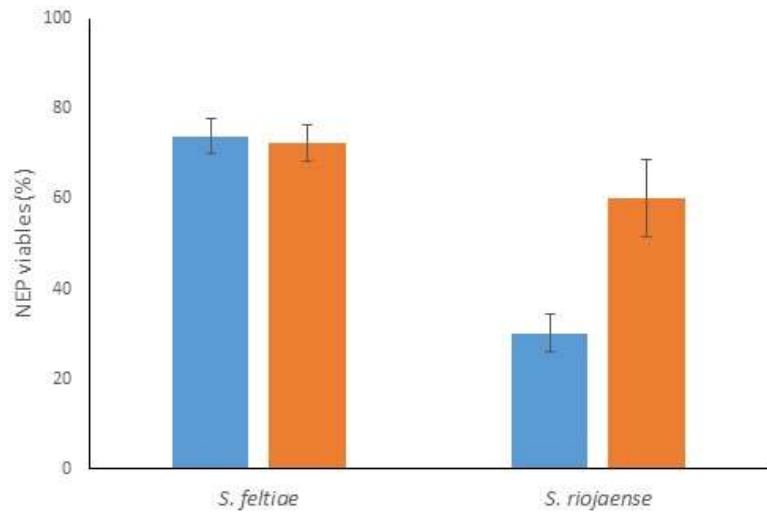
### 3.2 NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS

#### 3.2.1 VIABILIDAD DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS

En el primer experimento, cuya concentración inicial fue de 4100 JI/2 ml para *S. feltiae* y de 28900 JI/2 ml para *S. riojaense*, se observaron diferencias significativas en la viabilidad de los NEP en función del tiempo de pretratamiento en glicerol precongelación ( $F_{1,24} = 6,493$ ,  $P = 0,019$ ) (Figura 14A). La viabilidad de los nematodos de *S. feltiae* fue significativamente superior a la observada para *S. riojaense* ( $F_{1,24} = 25,533$ ,  $P = 0,001$ ) (Figura 14A). Además, se observaron interacciones entre la especie y el tiempo de pretratamiento en glicerol ( $F_{1,24} = 8,005$ ,  $P = 0,010$ ), lo que indicó que mientras para *S. feltiae* el tiempo pretratamiento no fue limitante, para el nematodo *S. riojaense* el tiempo de 48 horas resultó más adecuado.

En el segundo experimento, únicamente se utilizaron nematodos de *H. bacteriophora*, en una concentración inicial de 5200 JI/ 2 ml. Se observaron diferencias significativas en función del tratamiento utilizado (incubación en glicerol o tratamiento control); el porcentaje de nematodos de *H. bacteriophora* viables tras el tratamiento control es mucho mayor que tras haberlos incubado en glicerol ( $F_{1,18} = 12243,087$ ,  $P = 0,000$ ) (Figura 14B). Por otro lado, no se observó un efecto en la viabilidad de *H. bacteriophora* en cuanto al tiempo de pretratamiento o de control (24 o 48 horas) ( $F_{1,18} = 0,971$ ,  $P = 0,341$ ) (Figura 14B). La interacción entre el tratamiento utilizado y el tiempo de tratamiento no es significativa en la viabilidad de los nematodos de *H. bacteriophora* ( $F_{1,18} = 0,053$ ,  $P = 0,822$ ).

**A**



**B**

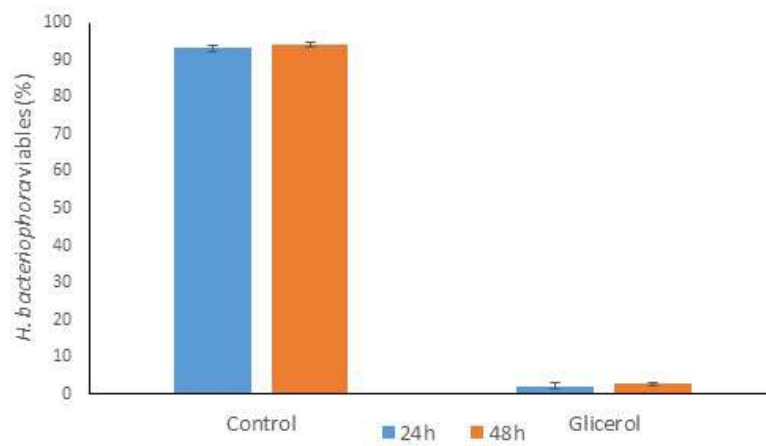


Figura 13. Efecto del tiempo de pretratamiento en glicerol al 15% en la viabilidad de los nematodos entomopatógenos *S. feltiae* y *S. riojaense* (Figura 14A, primer experimento). Comparación del efecto de la incubación en glicerol con el tratamiento control en la viabilidad de *H. bacteriophora*, y del tiempo de pretratamiento (24 o 48 horas) (Figura 14B, segundo experimento).



Para la congelación durante 24 horas, no se observaron diferencias significativas en la viabilidad de los NEP en función del tiempo de pretratamiento en glicerol previo a la congelación ( $F_{1,12} = 2,918$ ,  $P = 0,126$ ) (Figura 15A). No obstante, la viabilidad de los nematodos de *S. feltiae* fue significativamente superior a la observada para *S. riojaense*, cuya viabilidad es nula para el pretratamiento durante 24 horas e inferior al de *S. feltiae* en el pretratamiento durante 48 horas ( $F_{1,12} = 18,091$ ,  $P = 0,003$ ) (Figura 15A). Finalmente, no se observaron interacciones entre la especie y el tiempo de pretratamiento en glicerol ( $F_{1,12} = 1,264$ ,  $P = 0,293$ ).

De acuerdo con los resultados obtenidos para la congelación durante 24 horas, en la congelación durante 1 semana tampoco se observó un efecto significativo en la viabilidad de los EPN en cuanto al tiempo de pretratamiento en glicerol ( $F_{1,12} = 0,385$ ,  $P = 0,552$ ) (Figura 15B). Por otro lado, se apreciaron diferencias significativas con respecto a la utilización de una u otra especie en la viabilidad de los EPN, puesto que los nematodos de *S. riojaense* no fueron capaces de sobrevivir a la congelación ( $F_{1,12} = 16,305$ ,  $P = 0,004$ ) (Fig. 3B). La interacción entre la especie y el pretratamiento de glicerol utilizado no es significativa ( $F_{1,12} = 0,385$ ,  $P = 0,552$ ) (Figura 15B).

No se aportan figuras con respecto a la viabilidad tras la congelación del segundo experimento, puesto que no hubo nematodos que sobrevivieran.

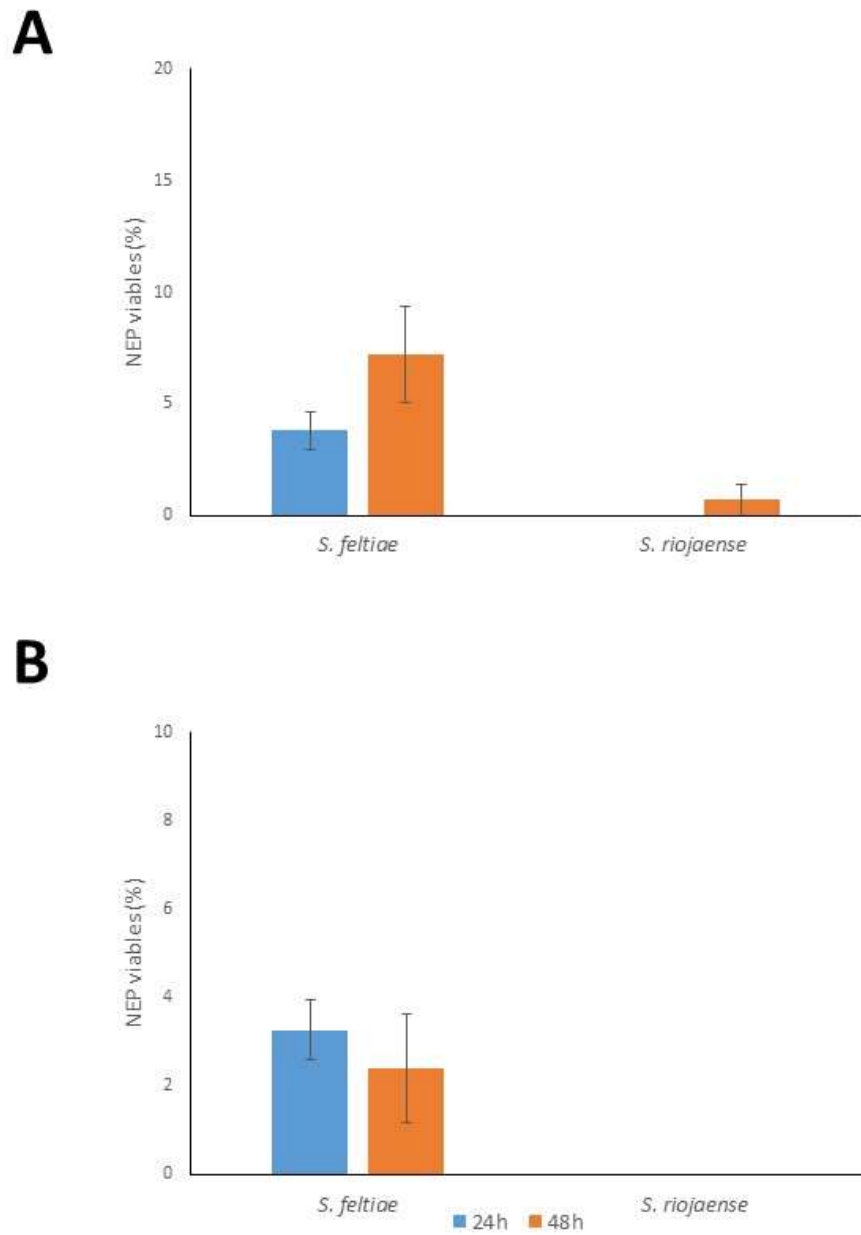


Figura 14. Efecto del tiempo de pretratamiento en glicerol al 15% en la viabilidad de los nematodos entomopatógenos (*S. feltiae* y *S. riojaense*) tras la congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas (Figura 15A) y 1 semana (Figura 15B).

Se observaron diferencias significativas en la capacidad infectiva de los NEP en función del tiempo de pretratamiento en glicerol previo a la congelación durante una semana, siendo favorable un tiempo de pretratamiento de 48 horas ( $F_{1,12} = 6,400$ ,  $P = 0,035$ ) (Figura 16A). Además, el factor especie tiene un efecto significativo sobre la capacidad infectiva de los NEP, ya que se observó que los nematodos de *S. riojaense* no fueron capaces de infectar a ninguna larva de *Galleria mellonella*, mientras que los nematodos de *S. feltiae* sí que lo hicieron ( $F_{1,12} = 10,001$ ,  $P = 0,013$ ) (Figura 16A). Se observaron interacciones entre la especie y el tiempo de pretratamiento en glicerol ( $F_{1,12}=6,400$ ,  $P = 0,035$ ) lo que indicó que, para las dos especies, con un tiempo de congelación de 24 horas, el tiempo de pretratamiento en glicerol que resultó más adecuado fue el de 48 horas, mientras que, para un tiempo de congelación de una semana, para *S. feltiae*, fue mejor el pretratamiento durante 24 horas (*S. riojaense* no consiguió sobrevivir a un tiempo de congelación de 1 semana con ningún tiempo de pretratamiento).

En cuanto a la congelación de los NEP durante una semana, no se observaron diferencias significativas en su capacidad infectiva en función del tiempo de pretratamiento en glicerol. ( $F_{1,12} = 0,167$ ,  $P = 0,694$ ) (Figura 16B). Lo mismo sucede con respecto al efecto de la especie sobre la capacidad infectiva de los NEP, aunque, se observó que la mortalidad en *G. mellonella* es algo superior cuando se ve infectada por *S. feltiae* ( $F_{1,12} = 1,500$ ,  $P = 0,256$ ) (Fig. 4B). La interacción entre la especie y el tiempo de pretratamiento en glicerol no resultó significativa ( $F_{1,12} = 0,167$ ,  $P = 0,694$ ) (Figura 16B).

Para estudiar la capacidad infectiva sobre *L. botrana* únicamente se utilizaron nematodos de *S. feltiae* tras un pretratamiento durante 48 horas en glicerol y una semana de criopreservación. Se observó que aproximadamente un 30% de las larvas de *L. botrana* fueron infectadas y murieron durante experimento.

No se observaron diferencias significativas en la capacidad infectiva de *H. bacteriophora* en función del tiempo que se mantuvieron dichos nematodos en el tratamiento control a 14°C (24 o 48 horas). No obstante, sí que fue algo superior el porcentaje de larvas de *G. mellonella* infectada por los nematodos mantenidos a 14°C durante 24 horas ( $F_{1,12} = 0,167$ ,  $P = 0,694$ ) (Figura 16C).

No se aportan figuras con respecto a la capacidad infectiva de *H. bacteriophora* tras su pretratamiento y congelación, ya que no se llevó a cabo la prueba de mortalidad sobre larvas de *Galleria mellonella* ni de *Lobesia botrana*, al no haber sobrevivido ningún nematodo a la congelación.

## 3.2.2 CAPACIDAD INFECTIVA DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS

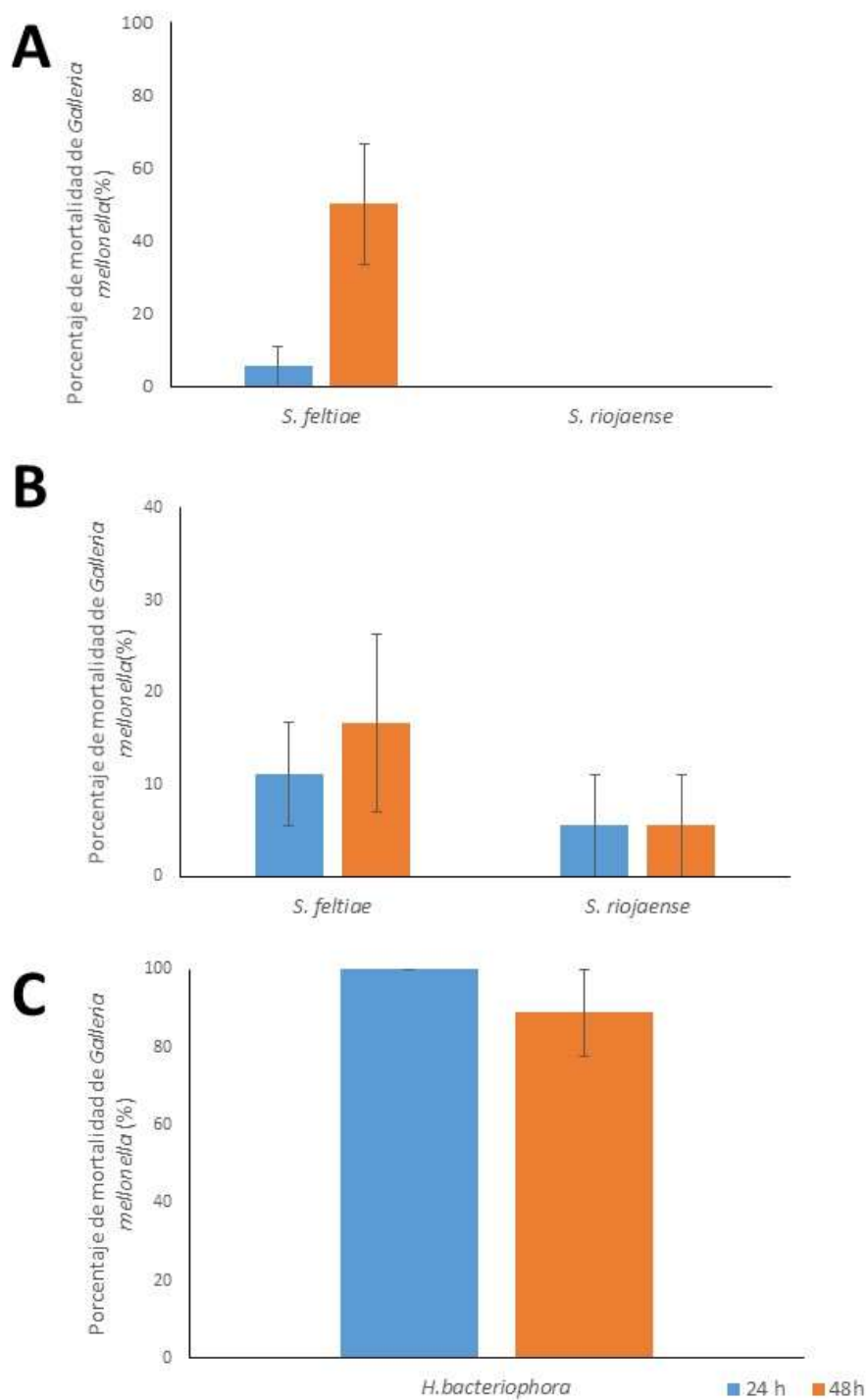


Figura 15. Efecto del tiempo de pretratamiento (glicerol 15%) en la capacidad infectiva de los nematodos entomopatógenos (*S. feltiae* y *S. riojaense*) sobre *Galleria mellonella* tras la congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas (Figura 16A) y 1 semana (Figura 16B). Capacidad infectiva de *H. bacteriophora* tras el tratamiento control (Figura 16C).

## 4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Una de las ventajas clave del mantenimiento por criopreservación de los nematodos es conseguir una colección que albergue gran variabilidad genética de organismos que puedan ser empleados como agentes de control biológico o modelos en investigación (como los NVL) en futuras investigaciones tanto del grupo como de otros investigadores colaboradores. El objetivo de este trabajo fue la implementación, por primera vez, de distintas técnicas de preservación como recurso de almacenaje a largo plazo. En esta primera aproximación preliminar, ninguno de los protocolos evaluados, tanto para NVL como para EPN, ha sido completamente satisfactorio, ya que la tasa de recuperación de la viabilidad ha estado lejos de llegar al 50%. Nuestros resultados están muy lejos de los descritos por Guide *et al.* (2016) para NEP, quienes reportaban valores superiores al 70% de viabilidad tras la exposición a glicerol, o para los NVL (Sommer, comunicación personal). No obstante, tanto en los NVL como en los NEP ha sido posible establecer multiplicaciones viables posteriores tras la ultracongelación, ya sea en el medio agar (NVL) o con la capacidad de matar y reproducirse en el insecto hospedador *G. mellonella* (NEP), lo que arroja datos preliminares muy valiosos para futuros protocolos de optimización.

La utilización de glicerol es la base de la criopreservación tanto en los NVL como en los NEP. En general, el glicerol no se considera nocivo *per se* para estos organismos, aunque puede provocar cierta inmovilidad temporal en ellos. Además, el glicerol puede llegar a provocar cambios en el citoplasma de las células de los nematodos, induciendo una menor capacidad infectiva (en el caso de los NEP) o incluso su muerte (Hammerstedt, 1992). La supervivencia de los nematodos a dichos cambios provocados por el glicerol varía entre especies, por lo que un buen protocolo de criopreservación optimizará de forma individual la concentración inicial de nematodos, así como la concentración de glicerol o el tiempo de exposición pretratamiento. En los NVL observamos que cuando la concentración inicial por tubo era elevada ( $> 1000$ ), el glicerol al 12% obtuvo mejores porcentajes de recuperación, tendencia opuesta cuando los nematodos estaban más diluidos por tubo. Por otro lado, en los NEP, el tiempo de preexposición de 48 horas mejoró la viabilidad en *S. riojaense* tras 1 día a  $-80^{\circ}\text{C}$ , resultados en concordancia con lo observado por Guide *et al.* (2016). Sin embargo, la viabilidad resultó similar en el caso de *S. feltiae* tanto a 1 día como 1 semana. En el caso de *H. bacteriophora*, hubo un fallo generalizado en la criopreservación ya que no sobrevivió ningún nematodo. En este sentido, aunque el tiempo de exposición al glicerol sea especie-dependiente, es posible que un tiempo inferior a 48 horas no sea suficiente para que el glicerol actúe como agente crioprotector y penetre en las células de los nematodos (Guide *et al.*, 2016). También Guide *et al.* (2016) observaron que un pretratamiento de 15% de glicerol resultó más eficaz para la criopreservación tras 48 h en *S. feltiae*. Por lo tanto, en futuras investigaciones se propone incrementar el tiempo de pretratamiento en los NEP (48h y

72h) y la concentración de glicerol (17% y 20%) para determinar si se mejoran los resultados. Por último, en cuanto a la viabilidad de los nematodos, otro factor determinante puede ser la velocidad en la etapa de descongelación. Curran *et al.* (1992) describieron que velocidades muy bajas pueden dar lugar a tasas muy bajas de nematodos viables, factor que ha podido influenciar en la recuperación de los NVL y NEP. Por lo tanto, también se podrá incluir como factor a investigar el tiempo/forma de descongelación de los NVL y los NEP.

Por otro lado, además de la supervivencia, en los NEP es importante mantener las características infectivas y capacidad de control de insectos intacta con respecto a los cultivos originales. En nuestro estudio, hemos demostrado que, bajo ciertas circunstancias, los NEP criopreservados aún mantienen su capacidad infectiva frente a larvas de *G. mellonella* y *L. botrana*, dato importante para estudios posteriores de selección de candidatos de biocontrol. No obstante, se observó que la especie y el tiempo de pretratamiento con glicerol afectó a la capacidad de control de los NEP tras incubación durante 24 horas a -80°C, fenómeno cuyo efecto se minimizaba tras una semana de incubación. Por lo tanto, además de verificar la mejora en la viabilidad de los JI es imprescindible verificar la capacidad infectiva en los insectos diana a trabajar para no perder el potencial genético de la colección por un mal almacenamiento.

Por último, una de las mejoras para la criopreservación de NVL puede ser la sincronización de cultivos de nematodos para inducir los estados de larva *dauer*, ya que son las formas de resistencia de estos nematodos y, así, se podría conseguir una mayor tasa de supervivencia al tratamiento (Suárez-Sánchez *et al.*, 2012).

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aparecida Guide B., Alves V.S, Paes Fernandes T.A, Pinhatari Ferreira F., Oliveira Janeiro Neves P.M (2016). Glycerol as a cryoprotetant agent to the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp.

Barrière A., Félix M.-A. Isolation of *C. elegans* and related nematodes (2014), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.115.2, <http://www.wormbook.org>

Boemare, N. (2002). Systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In R. Gaugler (Ed.), *Entomopathogenic nematology* (p. 35–56). Wallingford, U.K.: CABI Publishing.

Campos-Herrera, R. (2015). Nematode pathogenesis of insects and other pests. *Sustainability in plant and crop protection* (Volume 1). Book Springer.

Chen, G., Dunphy, G. B., y Webster, J. M. (1994). Antifungal activity of two *Xenorhabdus* species and *Photorhabdus luminescens*, bacteria associated with the nematodes *Steinernema* species and *Heterorhabditis megidis*. *Biological Control*, 42, p. 157–162.

Coscollá R. (1997). La polilla del racimo de la vid (*Lobesia botrana* Den. y Schiff). Valencia, Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación, D.L.

Del Tío, M. R. (1996). Estudios biológicos y modelos de predicción para el control integrado de *Lobesia botrana* Den. & Schiff. (Lepidoptera, Tortricidae) en el marco de Jerez. Memoria de Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.

Georgis, R. (1990). Formulation and application technology. In R. Gaugler & H. K. Kaya (Eds.), *Entomopathogenic nematodes in biological control* (p. 173–191). Boca Ratón, FL: CRC Press.

Glazer, I (2002). Survival biology. Gaugler, R. (Ed.) *Entomopathogenic nematology*. Wallingford, UK: Cabi International p. 169-188.

Golden, J.W y Riddle, D.L. (1984b). The *Caenorhabditis elegans* dauer larva: developmental effects of pheromone, food and temperature. *Developmental Biology*, 102, p. 368-378.

Herrmann M., Mayer W.E, Sommer R.J (2006). Nematodes of the genus *Pristionchus* are closely associated with scarab beetles and the Colorado potato beetle in Western Europe. *Zoology* 109 p. 96-108.

J. Suárez-Sánchez, R. Alatorre-Rosas, H.M. Poggi-Varaldo y J. Barrera-Cortés (2012). Efecto del tamaño de inóculo en la producción axénica in vitro de *Steinernema carpocapsae*.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2004). Los parásitos de la vid. Estrategias de protección razonada. Coedición MAPA – Mundi-Prensa.

Poinar, G. O., Jr. (1990). Entomopathogenic nematodes in biological control. In R. Gaugler y K. H. Kaya (Eds.), *Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae* (pp. 23–74). Boca Raton, FL: CRC Press, Inc.

Popiel I., Vasquez E.M (1991). Cryopreservation of *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. *Journal of Nematology*, Loudonville p. 432-437.

Román-Fernández, L.R., Martínez-García, H., Pérez-Moreno, I., Marco-Mancebón, V.S. (2013). Sistemas de control actuales contra la polilla del racimo. *Vida Rural*, 364: 48-52.

Sáenz de Cabezón, F. J. (2003). Aportaciones al manejo integrado de *Lobesia botrana* (Den. & Schiff.) (Lepidoptera: Tortricidae): Evaluación de la eficacia de lufenuron, metoxifenocida y azadiractina y modelización del desarrollo. Memoria de Tesis Doctoral. Universidad de La Rioja.



Stiernagle, T. Maintenance of *C. elegans* (February 11, 2006), *Wormbook*, ed. The *C. elegans* Research Community.

Sulston, J., Hodgkin, J. (1998). The Nematode *Caenorhabditis elegans*, W.B Wood, ed (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory press), p.587.

Vemmer, M.y Patel, A. V. (2013). Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biological Control*, 67(3), 380–389.

Woodring, J.L., Kaya, H.K., 1988. Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: a handbook of biology and techniques. Southern Cooperative Series Bulletin 331. Arkansas Agricultural Experiment Station, Arkansas.

## ANEXO I

### *Soluciones utilizadas en el estudio y modo de preparación*

#### **Agua MilliQ**

**Buffer M9.** Para la preparación de Buffer M9, se pesaron 30 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 60 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 50 g de NaCl, 10 ml de  $\text{MgSO}_4$  1M y agua MilliQ hasta enrasar a 1L.

**Soft Agar Freezing Solution.** Para la obtención de los medios Soft Agar Freezing Solution, se pesaron 0,58 g de NaCl, 0,68 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,56 ml de NaOH 1M, 0,4 g de Agar, 30 g o 24 g de glicerol (según la concentración) y agua MilliQ hasta enrasar a 100 ml. Tras el pesado, se procedió a su autoclavado.

**Nutrient Agar** (ref. Fluka Analytical). Se suspendieron 28 g de Nutrient Agar en 1 litro de agua destilada. Se llevó a ebullición para disolverlo por completo. Se autoclavó a 121°C durante 15 minutos para garantizar su esterilidad. Se prepararon placas de 9 cm y 5 cm de diámetro.

**Glicerol 30%.** Para preparar la solución con glicerol al 30% en un frasco de 500 ml se vertieron 90 ml de glicerol y 200 ml de agua MilliQ.

**Solución salina.** Para preparar la solución salina, en un frasco se echaron 7 g de NaCl y se enrasó con agua MilliQ hasta los 1000 ml.